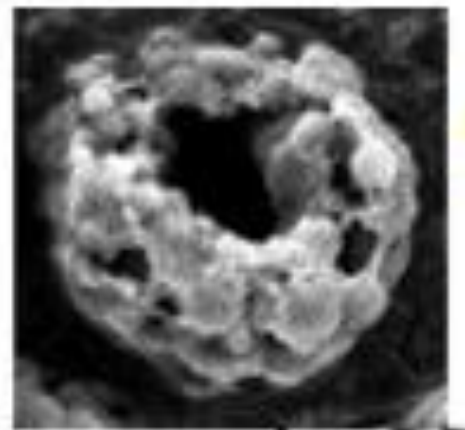




UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA



MICROAGREGADOS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA DIRECCIONAMIENTO PASIVO DE ACTIVOS

Ángela Rodríguez Serrano



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

MICROAGREGADOS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA DIRECCIONAMIENTO PASIVO DE ACTIVOS

Trabajo Fin de Grado de carácter bibliográfico presentado por Ángela Rodríguez Serrano, siendo la tutora del mismo Lucía Martín Banderas.

Fecha de presentación:	Julio 2018
Lugar de presentación:	Facultad de Farmacia
Tipo de trabajo:	Bibliográfico

RESUMEN

La nanomedicina es una ciencia que engloba tres grandes áreas generales: nanodiagnóstico, nanoterapia y medicina regenerativa, todas ellas impulsadas por la creciente necesidad de buscar métodos alternativos a la medicina convencional. El avance en la nanotecnología ha supuesto una herramienta muy valiosa en el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades vasculares y pulmonares, mejorando aspectos en la formulación, y con ello la eficacia y la seguridad del tratamiento. Concretamente, esta revisión se centra en las aplicaciones más interesantes de los microagregados, estructuras que combinan las micro- y las nanopartículas, ofreciendo ventajas en el direccionamiento de activos.

La estenosis es una característica común a muchas enfermedades vasculares como arteriosclerosis o accidente cerebrovascular. La formulación de microagregados de nanopartículas con activador tisular del plasminógeno, tPA, ha supuesto una gran innovación entre las terapias trombolíticas, gracias a que estas estructuras aprovechan el alto estrés de cizalla, producido por el estrechamiento de los vasos, para recomponerse en estructuras nanométricas, capaces de deshacer los coágulos. Sin embargo, el uso de este fármaco se encuentra limitado por dos factores fundamentalmente, la estrecha ventana terapéutica y las complicaciones hemorrágicas que presenta.

Por otro lado, los tratamientos de enfermedades pulmonares habituales en clínica presentan problemas relacionados con el tamaño de las partículas, siendo la mayoría de ellas demasiado pequeñas para alcanzar el pulmón profundo lo que radica directamente en la eficacia del mismo. Para intentar revertir dicha problemática se desarrolló una formulación que posee tanto nanoestructura como microestructura, aumentando la absorción del fármaco y mejorando la administración al lugar de acción, respectivamente.

Palabras clave: nanopartícula, microagregado, tensión de cizalla, enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias

ABSTRACT

Nanomedicine is a science that includes three major areas: nanodiagnosis, nanotherapy and regenerative medicine. It is promoted by the increasing necessity to look for an alternative to conventional medicine. The advance in nanotechnology has been a very valuable tool in the development of new therapies for vascular and pulmonary diseases, improving aspects in the formulation, and the efficacy and safety of the treatment. Specifically, this review focuses on the most interesting applications of microaggregates, structures that combine micro and nanoparticles, offering advantages in drug targeting.

Stenosis is a common feature of many vascular diseases such as arteriosclerosis or stroke. The formulation of micro-aggregates of nanoparticles with tissue plasminogen activator, tPA, has been a great innovation among thrombolytic therapies. This is possible thanks to these structures response to high shear stress, produced by the narrowing of the vessels. This way, these microstructures disaggregate themselves into nanometric structures able to dissolve the clots. However, the use of this drug is limited by two factors fundamentally, the narrow therapeutic window and the hemorrhagic complications that it presents.

On the other hand, the treatments of pulmonary diseases that are common in the clinic present problems related

ated to the size of the particles, most of them being too small to reach the deep lung, which is directly related to the effectiveness of the same. To try to reverse this problem, a formulation was developed that possesses both nanostructure and microstructure, increasing the absorption of the drug and improving the administration to the place of action, respectively.

Key words: “nanoparticle”, “microaggregate”, “shear stress”, “vascular disease”, “pulmonary disease”

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. OBJETIVOS.....	15
3. METODOLOGÍA.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. <u>Sistema vascular</u>	17
4.2. <u>Sistema pulmonar</u>	29
5. CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

1. INTRODUCCIÓN

“La nanotecnología es la ciencia del diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y el tamaño a escala nanométrica” (Aston et al., 2005), siendo el nanómetro la millonésima parte de un metro, 10^{-9}

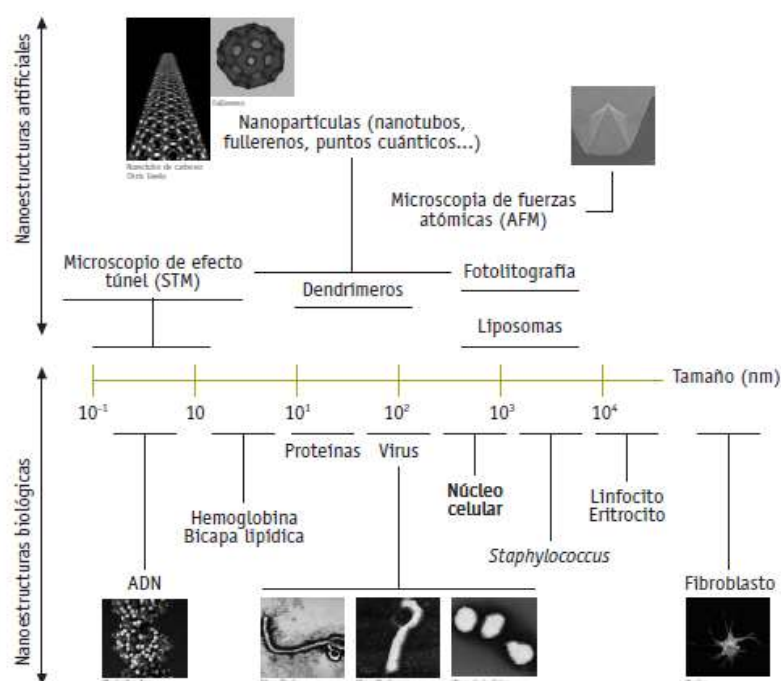


Figura 1. Esquema de la escala nanométrica y ejemplos de nanopartículas artificiales y biológicas (Ruiz et al., 2006)

Desde hace unos años está siendo una rama emergente y de elevado potencial debido al cambio que sufren las propiedades físicas y químicas de los materiales cuando se encuentran en esta escala nanométrica: la resistencia, el color o la elasticidad son algunas de las propiedades que se ven modificadas y que están siendo utilizadas en diversos ámbitos (Lechuga, 2010).

Existen fundamentalmente dos enfoques para fabricar nanopartículas: “*Top-down*” de arriba hacia abajo y “*Bottom-up*” de abajo hacia arriba.

El primer método consiste en la producción de nanoestructuras a partir de un gran volumen de material hasta llegar a la dimensión deseada, se emplean técnicas como la litografía, la escritura o el estampado para definir las características esperadas. Por

otro lado, “*Bottom-up*” construye átomo por átomo o molécula por molécula; una técnica empleada es el autoensamblaje en la que los átomos o las moléculas se organizan en estructuras debido a sus propiedades (figura 2).

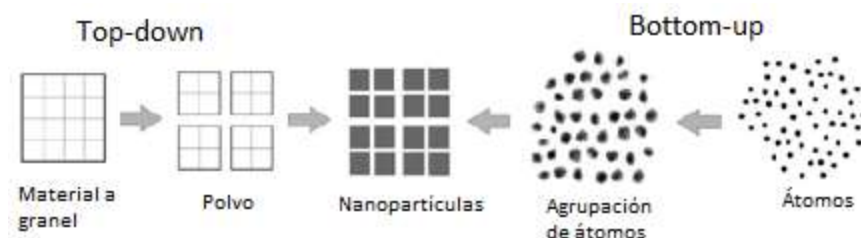


Figura 2. Esquema de producción de nanopartículas. En la síntesis de nanopartículas a partir del método “Top-down” se parte de materiales a gran escala hasta conseguir el sistema deseado y en el método “Bottom-up”, los átomos son los primeros implicados en la formación de las nanopartículas (Adaptada de Runowski, 2016)

El principal reto para la fabricación “*Top-down*” es crear sistemas cada vez más pequeños y con gran precisión mientras que para “*Bottom-up*” es crear estructuras lo suficientemente grandes y con la calidad adecuada para que puedan servir como materiales (Dowling et al., 2004). En los últimos años, ha habido un gran progreso en la convergencia de estas ideas, donde el control descendente se utiliza para guiar los procesos ascendentes (Isaacoff & Brown, 2017).

La llegada de la nanotecnología a las ciencias de la salud da lugar a la *nanomedicina* que tiene como objetivo desarrollar herramientas para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades cuando están en estados poco avanzados o en el comienzo de su desarrollo; emplean nanoestructuras capaces de interactuar a nivel molecular (Lechuga, 2010) ya que la mayoría de los procesos biológicos ocurren a este nivel y puede resultar muy útil para detectar y resolver diversas patologías.

La nanomedicina engloba tres áreas fundamentales: nanodiagnóstico, nanoterapia o liberación controlada de fármacos y, medicina regenerativa.

El diagnóstico a escala nano ha ido evolucionando por la creciente necesidad de satisfacer la demanda de diagnósticos clínicos más sensibles y que puedan realizar una detección más precoz de la enfermedad, permitiendo una rápida actuación en cuanto a terapia se refiere.

Se define nanodiagnóstico como el uso de la nanotecnología para fines diagnóstico (Press, 2017). Su fundamento es la utilización de nanodispositivos y sistemas de contraste, incluyendo la manipulación y valoración de moléculas individuales y, adaptación de sistemas para que sus propiedades puedan ser utilizadas a nanoescala y así, poder llevar a cabo la interacción entre superficies y biomoléculas (Baptista, 2014).

Los nanodispositivos pueden utilizarse *in vitro* o *in vivo*, siendo los últimos los que más requisitos de biocompatibilidad deben cumplir ya que tienen contacto directo con el organismo para identificar y cuantificar, por ejemplo, una población de células malignas causantes de la enfermedad (Dawidczyk et al., 2014).

Entre los dispositivos de diagnóstico *in vitro* destacan: (I) los biosensores, (II) microarrays o biochips de genes, proteínas, células y (III) Lab-on-a-chip. El primero de ellos, los biosensores, son capaces de reconocer una molécula biológica, su actividad o concentración en el organismo. Son ideales para hacer medidas simultáneas de diversos parámetros y realizar barridos de alto rendimiento (HTS) (Ruiz et al., 2006). Los biochips se caracterizan por llevar incorporado un sistema de transducción de la interacción, es decir, se anclan, por ejemplo, en biochips de proteínas, proteínas activas funcionalmente para estudiar la actividad bioquímica. El último de los dispositivos, Lab-on-a-chip “Laboratorio en un chip” es un término que surge de integrar varias funciones en un solo dispositivo permitiendo la preparación de la muestra, purificación, mezcla, detección y almacenamiento, entre otras funciones.

La mayoría de los diagnósticos *in vivo* se basan en técnicas de imagen, pero también incluyen dispositivos implantables. Dentro de las técnicas de imagen podemos citar la resonancia magnética, espectroscopia y fluorescencia entre otras; todas ellas dependen de la identificación de agentes de contraste que se hayan introducido en el cuerpo para marcar el lugar de la enfermedad. Uno de los objetivos del diagnóstico *in vivo* es crear agentes que también puedan administrar y monitorear la terapia. A partir de esta idea surge ‘find, fight and follow’, “encontrar, luchar y seguir” el diagnóstico precoz, la terapia y el control de la terapia, todo ello se engloba en el término teranóstico (Boisseau & Loubaton, 2011).

La liberación controlada de fármacos o nanoterapia es uno de los grandes retos de la medicina y, en concreto de la nanomedicina actual. Dicha disciplina propone un

concepto llamando “Direccionamiento de activos “o *drug targeting* en el cual se pone de manifiesto la capacidad del fármaco para acumularse en el lugar de acción de manera selectiva y cuantitativa, independientemente de la vía de administración (Torchilin, 2000). El direccionamiento puede producirse de manera pasiva cuando la nanoestructura recibe un determinado estímulo interno (pH, presencia de enzimas o un cambio del potencial redox) o externo (luz, temperatura, campo magnético) (Mura et al., 2013) o de manera activa, funcionalizando su superficie con moléculas o ligandos específicos (proteínas, anticuerpos, péptidos, etc.) capaces de unirse a un receptor concreto (figura 3).

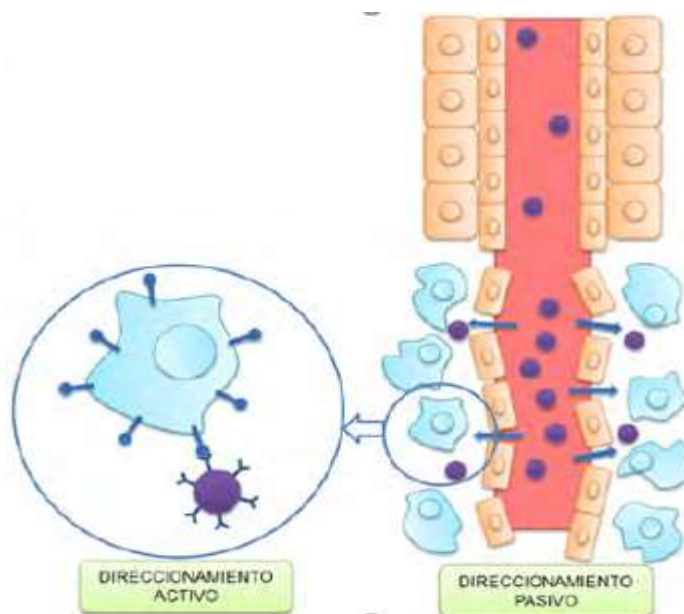


Figura 3. Mecanismo de direccionamiento de fármacos activo y pasivo; se puede observar como en el direccionamiento pasivo las nanopartículas liberan el fármaco cuando reciben un estímulo mientras que en el direccionamiento activo la superficie se funcionaliza con algún ligando específico de uno de los receptores presentes en la célula afectada (Adaptada de Doello et al., 2015)

Existen distintos tipos de nanosistemas de liberación de fármacos, clasificándose de forma general en dos grandes grupos (Torchilin, 2014):

- (1) Nanoestructuras orgánicas. Bajo esta clasificación se encuentran aquellas construidas con materiales poliméricos como nanoesferas, nanocápsulas, liposomas, micelas, dendrímeros y conjugados polímero-cápsula.
- (2) Nanoestructuras inorgánicas. En este grupo se encuentran las nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de sílica mesoporosa y nanotubos de carbono.

Todas las nanoestructuras deben cumplir las siguientes características: baja toxicidad, correctas propiedades de transporte y liberación del fármaco y, vida media larga.

Así mismo, cumplen unos objetivos comunes: (I) ser capaces de transportar fármacos de manera específica y controlada, (II) evitar problemas relacionados con la solubilidad y (III) proporcionar alternativas a las vías de administración tradicionales.

Con los avances en la nanomedicina se ha podido hacer frente a problemas presentes en los fármacos tradicionales como baja solubilidad o baja concentración en los tejidos diana, disminuyendo el efecto terapéutico. Los nanofármacos como liposomas o micelas pueden crear ambientes tanto hidrófilos como hidrófobos aumentando la solubilidad del fármaco. Además, los nuevos sistemas de liberación incrementan la liberación del fármaco en el tejido diana. De esta manera se solventarían los problemas mencionados anteriormente (Ruiz et al.,2006).

El concepto anteriormente mencionado de “direccionamiento pasivo” de fármacos surgió a finales de la década de los 70 con el uso de liposomas termosensibles para la liberación del fármaco a través de hipertermia. Desde entonces, se ha llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones sobre materiales sensibles a estímulos, en especial sobre las características de su diseño y aplicaciones.

Los materiales pueden ser sensibles a estímulos exógenos como temperatura, ultrasonido, luz, campo magnético, electricidad o endógenos como pueden ser pH, potencial redox, enzimas (Mura et al., 2013).

1. Liberación de fármacos en respuesta a estímulos exógenos.

Temperatura. La administración de fármacos con capacidad de respuesta térmica se encuentra entre una de las estrategias más sensibles a los estímulos que se investigan en oncología. Esta respuesta a la temperatura se rige por un cambio agudo no lineal en las propiedades de alguno de los componentes del nanovehículo, al cambiar la temperatura circundante se desencadena la liberación del fármaco. Idealmente los nanovehículos deben retener su carga a temperatura corporal, ~37C y liberar el fármaco dentro del tumor calentado localmente a ~40-42 C para contrarrestar el rápido tiempo de paso de sangre y lavado del tumor.

La hipertermia local se ha utilizado para el control de los sistemas on-off, los cuales se ponen en funcionamiento cuando hay un estímulo de cambio de temperatura.

Campo magnético. Los sistemas de respuesta magnética permiten una amplia diversidad en la vía de administración debido a la diferente naturaleza que puede adoptar la respuesta magnética, es decir, puede ser un aumento de temperatura cuando se aplica un campo magnético alterno, una guía magnética bajo un campo magnético permanente, o ambos cuando se usan de manera alternativa. La guía magnética se obtiene focalizando un campo magnético externo en el objetivo biológico durante la administración de la nanoestructura consiguiendo una mejor acumulación del fármaco en los tumores sólidos. El calor generado por un campo magnético oscilante o alterno (AMF) también se puede usar para lograr una liberación de fármaco pulsátil bajo demanda. Uno de los ejemplos más llamativos son materiales inteligentes formulados con nanopartículas magnéticas que permiten el suministro de fármacos on-off al hincharse o deshincharse el polímero.

Ultrasonido. Representa un método muy efectivo para controlar el espacio-tiempo de la liberación del fármaco en el sitio deseado. Evitan así los efectos secundarios perjudiciales en los tejidos sanos debido a su carácter no invasivo y a la posibilidad de regular la penetración del tejido mediante la frecuencia y tiempo de exposición. La liberación del fármaco se produce por efectos térmicos y/o mecánicos generados por fenómenos de cavitación o fuerzas de radiación.

Luz. Se han diseñado en los últimos años una gran cantidad de sistemas fotosensibles para lograr la liberación del fármaco por modificaciones estructurales (fotodimerización o fotoisomerización) del sistema en respuesta a la luz a una determinada longitud de onda (ultravioleta, visible o regiones cercanas al infrarrojo (NIR)). El principal inconveniente que presenta esta técnica es la baja profundidad de penetración (-10mm) que resulta de las fuertes propiedades de dispersión de los tejidos blandos en la región ultravioleta visible. Por lo tanto, la administración de fármacos inducida por la

luz convencional solo es posible en regiones del cuerpo que se exponen a la luz directamente como los ojos o la piel.

Electricidad. Los campos eléctricos débiles, de alrededor de 1V pueden ser usados para lograr la liberación del fármaco pulsada o sostenida a través de mecanismos como electroporación o iontoforesis.

2. Liberación de fármacos en respuesta a estímulos endógenos.

pH. El cambio de pH está siendo muy utilizado para activar la liberación del principio activo cuando se producen variaciones de pH asociado a determinadas patologías. Existen dos estrategias: el uso de polímeros con grupos ionizables que experimentan cambios conformacionales y/o de solubilidad frente a cambios de pH y el diseño de estructuras poliméricas con enlaces sensibles a ácidos cuya rotura provoca la liberación del fármaco.

Reacciones Redox. Algunos enlaces son propensos a una escisión por parte, por ejemplo, del glutatión; hablamos de los enlaces disulfuros que son sensibles a reacciones redox y se encuentran formando parte de la estructura de micelas del conjunto dendrímero-fármaco. La liberación del fármaco en el citosol puede desencadenarse por las concentraciones de glutatión que se encuentran en compartimentos extracelulares e intracelulares y, en tejidos tumorales.

Algunas micelas formuladas con cadenas PEG desprenden estas cadenas en un entorno reductor, otras estructuras tienen respuesta a la oxidación en tejidos inflamatorios ya que estos se caracterizan por la liberación de especies reactivas de oxígeno.

Enzimas. La expresión de enzimas específicas tales como proteasas o glucosidasas en condiciones patológicas puede emplearse para la liberación de fármacos en respuesta a estas enzimas en la diana deseada. El uso de secuencias peptídicas cortas, por ejemplo, escindibles por un grupo determinado de enzimas hace posible que la carga farmacológica quede expuesta al objetivo biológico deseado.

Autorregulación. Los sistemas capaces de responder a cambios en la concentración de analitos consiguen la administración autorregulada de fármacos. Tiene especial importancia en el diseño de fármacos para el

tratamiento de la diabetes el cual debe tener una especial sensibilidad a la glucosa. Una estrategia utilizada es aprovechar la capacidad del ácido fenilborónico para interactuar con la glucosa y así poder liberar insulina. Para ello se formularon micelas de diversos polímeros, pero la capacidad de respuesta de estos requirió grandes concentraciones de glucosa lejos de las condiciones fisiológicas que se pueden dar.

Mecánico. Los vasos sanguíneos con trombos o estenosis presentan características físicas que los distinguen ya que el estrés por cizalla del fluido aumenta localmente. Las plaquetas circulantes se activan localmente por el alto esfuerzo cortante en esta región y se adhieren al revestimiento de la superficie de los vasos estrechados. Como consecuencia de este mecanismo natural de fijación plaquetaria se ha desarrollado una estrategia terapéutica que utiliza el estrés de cizalla para dirigir el tratamiento a regiones de vasos sanguíneos dañados. Los nanoterapéuticos activos por cizalla (SA-NTs) se fabrican como agregados de nanopartículas (Korin et al., 2012).

3. Liberación de fármacos en respuesta varios estímulos

La sensibilidad a varios estímulos puede mejorar mucho la administración de fármacos. En algunos de los objetivos biológicos coexisten varios estímulos como puede ser la existencia de un gradiente de pH y un entorno oxidativa, pH y temperatura o temperatura y campo magnético, todo en condiciones patológicas. Se ha demostración una mejor activación del fármaco en respuesta a doble estímulo, pero a pesar de esta ventaja son sistemas complejos que necesitan pruebas de respuesta a cada estímulo in vivo e in vitro (Torchilin, 2014).

El direccionamiento activo de fármacos centra sus investigaciones en oncología para una liberación específica y preferente del fármaco en el tejido dañado por el tumor y, evitar los efectos secundarios en tejido sano. Esta orientación se basa en la funcionalización de la superficie de las nanopartículas con moléculas que son reconocidas por la sobreexpresión de determinados tipos de receptores de superficie en células tumorales.

Existen numerosas moléculas que pueden actuar como ligandos específicos: (I) anticuerpos monoclonales (mAB) hacia receptores sobreexpresados en determinados tumores como HER2 en cáncer de mama o EGFR en cáncer colorrectal; (II) fragmentos de anticuerpo como los fragmentos de unión a antígeno (Fab) o fragmentos variables de cadena simple (scFV), permite que se unan múltiples moléculas de direccionamiento a un solo nanovehículo lo que mejora la eficacia y especificidad; (III) aptámeros, es decir, oligonucleótidos de ADN o ARN cortos monocatenarios que se pliegan en estructuras tridimensionales secundarias y terciarias que los hacen capaces de unirse a objetivos biológicos específicos (IV) ligandos como proteínas (transferrina) o moléculas pequeñas (ácido fólico) (Samson et al., 2017).

La última área que engloba la nanomedicina es la medicina regenerativa; busca el mantenimiento, mejora o restauración de funciones biológicas a nivel de células, tejidos y órganos aplicando técnicas relacionadas con terapia celular, ingeniería tisular, administración de sustancias biorregenerativas y terapia génica; todas ellas estimulan los propios mecanismos reparados del organismo (Boisseau & Loubaton, 2011).

2. OBJETIVOS

El OBJETIVO GENERAL del presente trabajo de revisión es estudiar el potencial uso de estructuras nanométricas para la liberación controlada de fármacos. En concreto, en microagregados de nanopartículas poliméricas para el direccionamiento de fármacos.

Para alcanzar este objetivo se plantean los siguientes objetivos parciales:

- I. Estudiar cómo se formulan estos microagregados, englobando cuales son los polímeros más utilizados en cuanto a su biodisponibilidad y biocompatibilidad con el organismo.
- II. Analizar los métodos más utilizados en el desarrollo de estos sistemas.
- III. Enfermedades y/o patologías donde serían potencialmente útiles estas microestructuras para el direccionamiento de fármacos.

3. METODOLOGÍA

El trabajo se ha llevado a cabo realizando una búsqueda bibliográfica en las principales bases de datos *Pubmed*, *Science Direct* y *Scopus*. En cada una de las bases de datos se introdujeron palabras claves en función del contenido de cada uno de los diferentes apartados del trabajo. En la primera parte del trabajo, la Introducción, se utilizaron términos como “nanotechnology”, “nanotherapy”, “top-down and bottom-up” “nanoparticles”, “drug targeting”, “active targeting and pasive targeting” , “tissue plasminogen activator “.

Para el apartado de resultados y discusión se combinaron términos como “nanoparticles agglomerates”, “nanoparticles & shear stress & pulmonary”, “nanoparticles aggregates & blood clots “nanoparticles aggregates & shear stress”, “nanoparticles & agglomerates & inhalation”.

Además, se han utilizado las herramientas disponibles en cada una de las bases de datos para acotar la búsqueda de resultados tales como año o tipo de publicación.

Los artículos de revistas de alto impacto y las revisiones bibliográficas a partir del año 2005 han sido principalmente la fuente para el desarrollo de este trabajo, no se han tenido en cuenta los ensayos clínicos, resúmenes de congresos o artículos de revista de bajo impacto.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Analizando los artículos encontrados en las bases de datos más reconocidas y con las palabras claves descritas anteriormente podemos asegurar que la nanomedicina, y en concreto la liberación de fármacos es un campo que ha ido evolucionando de manera exponencial a partir del año 2005.

La figura 4 presenta un gráfico donde se determinan las disciplinas donde más se ha investigado el desarrollo de la liberación de fármacos desde 2005-2018.

Como puede observarse, se trata de un área altamente multidisciplinar

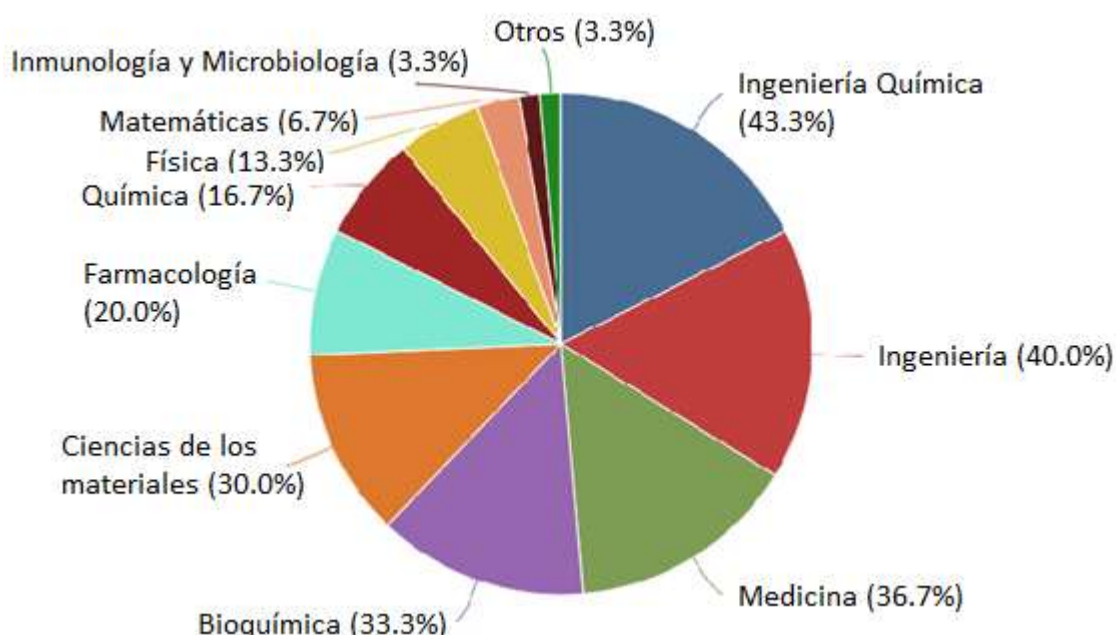


Figura 4. Gráfica donde se pueden observar las diferentes disciplinas que han publicado estudios sobre liberación de fármacos (Base de datos: *Scopus*)

La formulación de microagregados de nanopartículas es una estrategia que contiene muchas ventajas para la liberación de fármacos ya que permite combinar las ventajas de la escala micro y nano en un mismo sistema. A continuación, se exponen ideas más relevantes sobre la formulación de estos microagregados en enfermedades del sistema vascular y respiratorio.

4.1. Sistema vascular

La interrupción del flujo sanguíneo normal al corazón, pulmón y cerebro es la principal causa de muerte y discapacidad en adultos a largo plazo. La obstrucción de los vasos sanguíneos puede ser ocasionada por la aparición de trombos o émbolos y, por consiguiente, se produce una disminución del flujo sanguíneo. Actualmente, los enfoques para la terapia aguda de accidente cerebrovascular isquémico, infarto de miocardio, embolia pulmonar y aterosclerosis requieren la infusión de fármacos trombolíticos, que deben administrarse sistémicamente o mediante un catéter colocado dentro del vaso obstruido, generalmente en un hospital. Para que dichos fármacos sean efectivos, los pacientes deben recibir el tratamiento dentro de unas pocas horas después del inicio de los síntomas y las dosis deben de estar correctamente pautadas y administradas para evitar el riesgo de hemorragias que conlleva la administración de fármacos anticoagulantes.

Las patologías mencionadas hasta el momento representan solo cuatro ejemplos de enfermedades que podrían beneficiarse de la nanotecnología, ya que podrían aprovecharse de la misma todas las que comparten como característica común el estrechamiento vascular. Por ejemplo, síndrome coronario agudo, enfermedad vascular periférica, hiperplasia de la íntima vascular o vasoespasmo (Korin et al., 2013).

Las condiciones de flujo sanguíneo están estrictamente establecidas para garantizar la administración eficiente de oxígeno y nutrientes a los tejidos altamente metabólicos. La fuerza de fricción aplicada por el flujo sanguíneo es el principal factor determinante de la fisiopatología vascular.

Las plaquetas juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis normal y la trombosis. Después de su activación, las proteínas plaquetarias secretan factores procoagulantes y autoestimulantes, se adhieren a la superficie y se agregan. Además, se pueden activar por factores mecánicos cuando detectan tensiones de cizalla anormalmente altas, es decir, cambios en su microambiente físico. Para que ocurra dicha activación deben exponerse a esfuerzo de cizallamiento alto durante un periodo de tiempo suficiente.

Los flujos cerca de la pared estenosada son lentos, lo que permite a las plaquetas estar expuestas el tiempo suficiente para su activación. Seguidamente, aguas abajo de la zona estenosada el flujo desacelera, las plaquetas colisionan y se agregan promoviendo la formación de trombos. A medida que la estenosis va progresando, los efectos se vuelven dominantes y aumenta el riesgo de complicaciones (Epshtein & Korin, 2017).

La capacidad que adquieren las plaquetas para atacar áreas de estenosis vascular puede ser la causa de un accidente cerebrovascular (Korin et al., 2015).

En el sistema circulatorio, el estrés de cizalladura del fluido está altamente regulado y el diseño de los vasos sanguíneos tiende a restringir el esfuerzo cortante de la pared a un rango estrecho para minimizar el trabajo en condiciones fisiológicas; la regulación de este parámetro físico también es importante para modular el fenotipo de células endoteliales, la expresión génica, la agregación de plaquetas y eritrocitos, la arteriogénesis y la remodelación de la pared vascular. En enfermedades vasculares, las condiciones hemodinámicas pueden variar considerablemente en comparación con las condiciones normales (Korin et al., 2013).

El estrés de cizalla es generalmente beneficioso ya que promueve la dilatación adaptativa o remodelación estructural de la pared arterial a través de mecanismos mediados por el endotelio. Sin embargo, el endotelio disfuncional, en desequilibrio con sustancias activas de naturaleza endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el aumento de la permeabilidad vascular, es una manifestación temprana de enfermedades cardiovasculares como hipercolesterolemia, diabetes e hipertensión y trastornos inflamatorios sistémicos. En este contexto, la disfunción vascular generalmente se define como una dilatación, mediada por flujo, alterada a lo largo de un lecho arterial, en contraste con el deterioro en un sitio de lesión discreto (Davies, 2010).

Los vasos sanguíneos estenosados se identifican por un segmento de constricción local y unas características hemodinámicas anormales, las cuales desempeñan un gran papel en la progresión de la enfermedad vascular. Desde el punto de vista de la mecánica de fluidos, la región estenosada localmente induce un efecto Venturi en el

flujo, aparece una presión baja en el área estrecha del vaso y una alta presión aguas abajo de dicha área, donde el vaso se ensancha de nuevo.

Estos cambios están descritos por la ley de Bernoulli para flujos laminares:

$$\Delta P = \frac{\rho Q}{2} \left[\left(\frac{1}{A_2} \right)^2 - \left(\frac{1}{A_1} \right)^2 \right] P_2 = P_1 - \left(\frac{\rho Q}{2} \right) \left[\left(\frac{1}{A_2} \right)^2 - \left(\frac{1}{A_1} \right)^2 \right]$$

Donde ΔP es la diferencia de presiones $P_2 - P_1$, ρ la densidad del fluido, Q tasa de flujo y, A_1 y A_2 áreas de sección transversal. A medida que la estenosis va aumentando la diferencia de presión aumenta, y lo más importante, disminuye P_2 (Epshtein & Korin, 2017).

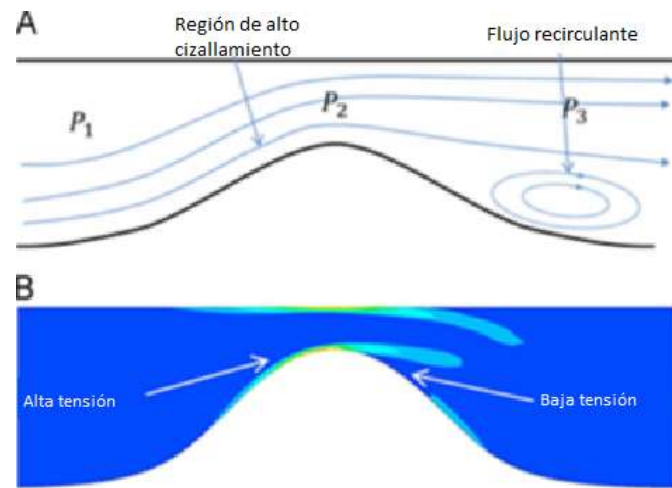


Figura 5. (A) En la ilustración podemos observar las líneas de corriente en un vaso sanguíneo estenosado. P_1 es la presión de entrada, P_2 la presión en la sección transversal mínima y P_3 es la presión aguas abajo de la constricción. En la ilustración (B) se representa de manera cualitativa la distribución de la tasa de deformación en el sitio de la estenosis de los vasos sanguíneos (Adaptada de Epshtein & Korin, 2017)

Los fluidos siempre discurren desde una zona de alta presión a una zona de baja presión. Con las condiciones de flujo descritas anteriormente, la capa límite puede desprenderse y plegarse sobre sí misma provocando un flujo de recirculación (figura 1A). Esto se produce porque, por definición, en la capa límite de un fluido se observa un gradiente de velocidades que va desde 0 en la zona de contacto con la superficie hasta el 100% de la velocidad observada en el fluido por encima de la capa límite. Esta velocidad 0 va ganando altura en dicha capa límite conforme avanza el fluido debido a dos factores; la fricción o fuerza de rozamiento experimentada entre el fluido y la superficie y, la diferencia de presión, que provoca una recirculación del aire en busca

de la zona de menor presión. La figura 1B muestra un mapa cualitativo de la velocidad de deformación alrededor de un vaso sanguíneo estenótico que muestra la región de alta tensión alrededor del vértice de la estenosis y la región de flujo de recirculación de bajo cizallamiento.

Se ha demostrado que la zona de flujo alterado y bajo cizallamiento induce disfunción endotelial y se correlaciona con la progresión del crecimiento de la placa (Davies, 2010). Si bien, la región de alto cizallamiento, por otro lado, se ha demostrado que induce activación plaquetaria contribuyendo así a las complicaciones aterotrombóticas (Epshtein & Korin, 2017).

El cuerpo ha desarrollado un mecanismo regulador mediante el cual las tensiones de corte hemodinámicas permanecen en unos límites en condiciones fisiológicas. En la Tabla 1 podemos observar cómo el estrés en condiciones basales es diferente si nos referimos a venas o arterias, por lo que debemos de tener en cuenta la localización de la patología vascular. Sin embargo, en las enfermedades vasculares, las condiciones cambian y por lo tanto las tensiones de corte hemodinámicas también. Por ejemplo, el estrés que soportan las paredes de las arterias oscila entre 10-60 dinas / cm², mientras que una reducción de la arteria de más del 90% conlleva una tensión superior a 1000 dinas / cm² (Korin et al., 2015).

Vasos sanguíneos	Estrés de cizalla (dinas /cm ²)
Arterias	10-60
Venas	1-10
Arterias estenosadas	
Media (>50%)	>100
Alta (>90%)	>1000

Tabla 1. Estrés de cizallamiento en vasos humanos normales y estenóticos (Adaptada de Korin et al., 2015)

La activación plaquetaria por un estímulo mecánico sirvió como inspiración para la creación de nanoterapeúticos activados por cizalla “SA-NTs”. A diferencia de los enfoques tradicionales de selección de fármacos sensibles a propiedades bioquímicas y

fisicoquímicas anormales de los tejidos dañados, como pH elevado o alta permeabilidad (Torchilin, 2007), estos nanovehículos usan potencialmente las condiciones físicas descritas anteriormente para administrar de forma selectiva fármacos a las regiones estenosadas.

Estos nanovehículos circulan como estructura agregada cuando fluyen en la sangre en condiciones de flujo fisiológico, pero se dispersan en sus componentes nanométricos cuando se exponen a un alto estrés de cizalla en las zonas de estenosis vascular. Estos nanoterapéuticos tienen un tamaño similar a las plaquetas (1 a 5 μm de diámetro) pero se formulan como agregados de nanopartículas.

El tamaño de los SA-NTs comparado con el de las nanopartículas reduce la probabilidad de que los primeros se puedan adherir a la pared del vaso, ya que experimentan fuerzas de arrastre más altas; en contraposición, las partículas nanométricas dispersas experimentan fuerzas de arrastre más bajas y, por lo tanto, se pueden adherir con más eficiencia a la superficie de la pared del vaso. Los agregados se mantienen unidos principalmente por fuerzas de Van-der-Waals que son relativamente débiles. Por consiguiente, los SA-NTs se pueden diseñar de tal manera que una vez que entren en áreas de alto estrés de cizalla, suficiente como para superar las fuerzas adhesivas que las une entre sí, puedan liberar las partículas nanométricas que contiene y adherirse a la superficie; al liberarse las nanopartículas el área superficial expuesta aumenta significativamente, y esto puede mejorar aún más la liberación o actividad de drogas o enzimas que están inmovilizadas dentro de estos nanovehículos (Korin et al., 2013). La eficiencia de dicha adhesión local se puede potenciar recubriendo las nanopartículas con moléculas que se unan a tejidos dañados, tales como la fibrina o enzimas relevantes. De esta manera, las nanopartículas se pueden concentrar localmente en sitios de oclusión vascular (figura 6).

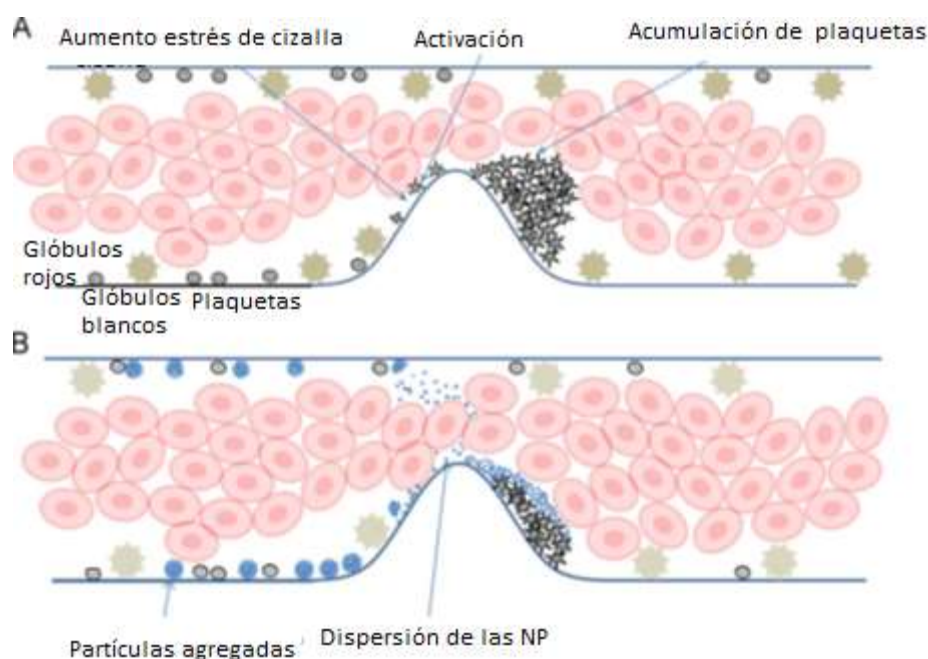


Figura 6. (A) Ilustración de activación de plaquetas por estrés de cizalladura cuando fluye a través de una estenosis vascular. Las plaquetas se activan en la zona de alto cizallamiento y se agregan en el sitio de estenosis aguas abajo del estrechamiento. (B) Ilustración del proceso de activación de los SA-NTs cuando fluyen a través de una estenosis vascular. Los nanovehículos se dispersan en sus portadores nanométricos en la zona de alto cizallamiento, que se adhieren y localizan en el sitio de la estenosis aguas abajo del estrechamiento (Adaptada de Epshtein & Korin, 2017)

Para producir SA-NT que liberan selectivamente agentes trombolíticos a las áreas estenóticas, los microagregados se funcionalizaron con activador tisular de plasminógeno (tPA), molécula anticoagulante aprobada por la FDA para el tratamiento del accidente cerebrovascular, infarto de miocardio agudo, aterosclerosis y embolia pulmonar (Epshtein & Korin, 2017).

El tPA es una enzima que cataliza la conversión de plasminógeno a plasmina; esta última es la enzima principal para la disolución de coágulos de sangre. Se cree que las células endoteliales vasculares son las principales fuentes de tPA plasmático implicado en la descomposición de coágulos de sangre. El endotelio activa el activador del plasminógeno, pero circula en el plasma como un complejo inactivo con el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).

El tPA maduro contiene 5 dominios: un dominio finger (F), un dominio de tipo de crecimiento epidérmico (EGF), dos dominios kringle (K1 y K2) y un dominio proteolítico de serina proteasa (SP), todos ellos con funciones diferentes que les permiten mediar

las múltiples bioactividades de la enzima a través de interacciones con sustratos, proteínas de unión y receptores (Medsker et al., 2016).

El tPA tiene una gran afinidad y especificidad por la fibrina, por lo que se une a un dominio específico del tPA. Así mismo, el plasminógeno se une a otro dominio del tPA formando un complejo ternario “plasminógeno / tPA / fibrina” que cataliza la conversión de plasminógeno en plasmina. La plasmina provoca la lisis de la fibrina promoviendo la rotura de la red de coágulos. El sistema trombolítico podría estar regulado por la $\alpha 2$ -antiplasmina y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). La $\alpha 2$ -antiplasmina es el principal inhibidor de la plasmina en el torrente sanguíneo, por lo que al inhibirlo no se originan productos de degradación de fibrina (figura 7).

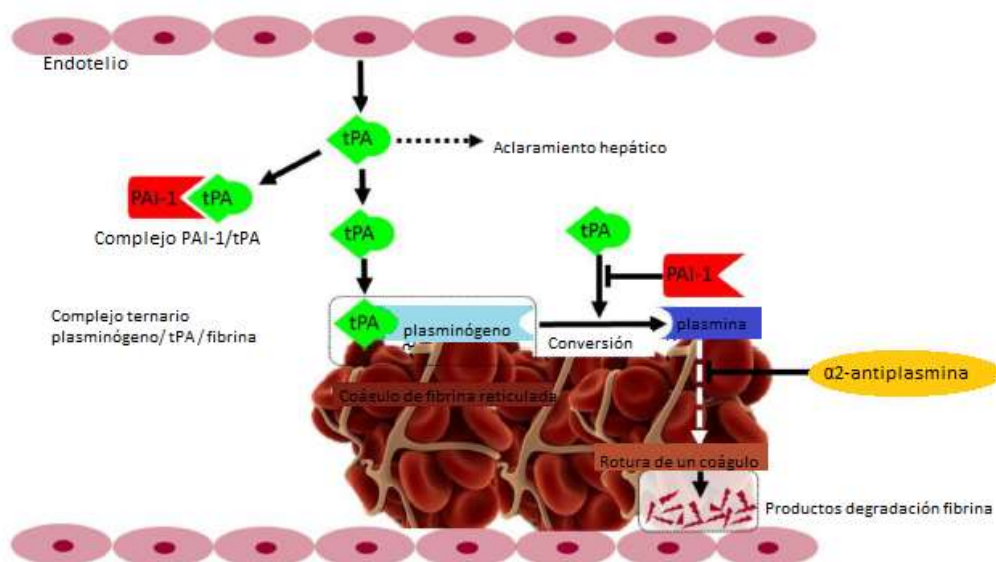


Figura 7. Vía trombolítica basada en tPA: El endotelio activa el activador del plasminógeno tisular (tPA) y circula en el plasma como un complejo inactivo con el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1). El plasminógeno y el tPA se unen a la superficie del coágulo de fibrina, formando un complejo ternario (plasminógeno / tPA / fibrina), que promueve la conversión de plasminógeno en plasmina. La plasmina provoca la lisis de la fibrina reticulada en productos de degradación de la fibrina. PAI-1 podría inhibir la activación del plasminógeno inducido por tPA. La $\alpha 2$ -antiplasmina inhibe la plasmina para crear productos de degradación de fibrina (Adaptación de Medsker et al., 2016)

Cabe destacar que los SA-NTs se activan antes de su paso por el segmento estenosado ya que la tensión de cizalla en la pared aumenta de manera significativa antes de que comience realmente la estenosis, esto puede explicarse geométricamente debido a la

entrada de sangre en forma de embudo hacia la estenosis o por la transición de flujo laminar a flujo turbulento (Saxer et al., 2013).

Aún no se sabe con certeza cuanto tiempo tarda en liberarse el fármaco del nanovehículo, por lo que la ubicación de la liberación del fármaco solo puede ser aproximada. Pero podemos asegurar que hay dos fenómenos que los dirigen hacia la estenosis: (I) el flujo pulsátil asegura que una cantidad de nanovehículo y fármaco permanecen cerca de la estenosis durante un determinado tiempo y (II) la rápida difusión del fármaco en las paredes del vaso nos certifica que hay una fricción importante del fármaco (Korin et al., 2012).

La dosis estándar de tPA recomendada por la FDA es de 0.9 mg / kg de peso corporal, el 10 % en forma de bolus intravenoso y lo restante en infusión durante una hora, siendo el máximo 90 mg (Medsker et al., 2016). La vida media del fármaco es aproximadamente 5 minutos.

Aunque la administración de tPA es un estándar para la descomposición de coágulos, presenta frecuentes y graves efectos secundarios entre los que destacan sangrado, hemorragia sistémica e intracraneal y toxicidad neuronal, lo que puede desencadenar la muerte del paciente (Korin et al., 2013).

Su uso está muy limitado por las complicaciones mencionadas anteriormente y por el estrecho margen terapéutico que presenta, se ha demostrado que el mejor resultado aparece si se administra el fármaco dentro de las 3-4.5 horas posteriores al inicio de los síntomas. Debemos destacar que, aunque el tPA sea una de las mejores opciones para la descomposición de coágulos solo del 4 al 7% de los pacientes con accidente cerebrovascular agudo reciben dicho tratamiento por el riesgo de complicaciones hemorrágicas y el estrecho margen terapéutico que presenta (Korin et al., 2015).

Aunque el tPA tenga efectos perjudiciales en la mayoría de las patologías, en diversos estudios se ha evidenciado sus efectos beneficiosos; se ha demostrado que el tPA desempeña un papel muy importante en la inhibición de la apoptosis neuronal y en la promoción de la recuperación funcional del accidente cerebrovascular. Además ejerce efectos opuestos en diferentes puntos de tiempo en el mismo objetivo (Haile et al., 2012).

Para examinar más a fondo la relevancia clínica de los SA-NTs para el tratamiento del embolismo pulmonar se hizo un ensayo con ratones, donde se le infundieron una solución con coágulos de fibrina y se acumularon en las arterias pulmonares principales. Se le administró inmediatamente SA-NTs recubiertos con tPA al grupo problema y fluido transportador a un grupo control durante 45 minutos. Todos los animales del grupo control murieron después de una hora después de la infusión con los coágulos y más del 80% de los ratones del grupo problema sobrevivieron. La principal relevancia clínica recae en la dosis cien veces menos que se requiere para la inducción de efectos de lisis de coágulos en comparación con tPA libre (Korin et al., 2012).

Los puntos clave de esta estrategia son conseguir que la cantidad de tPA que circule por el organismo sea mínima, administrar el fármaco localmente a los coágulos y así evitar que circule a otros tejidos y disminuir el riesgo de hemorragias. Existen actualmente algunas limitaciones para el uso de tPA como tratamiento principal del ictus ya que por ejemplo solo el 10-25 % de los casos logran una buena y permanente recanalización de los vasos, el tPA exógeno cruza tanto la barrera hematoencefálica intacta como la dañada en el tejido cerebral donde puede tener efectos neurotóxicos y provocar hemorragias intracraneales mortales (Medsker et al., 2016).

Estos sistemas de microagregados, SA-NTs, pueden ser útiles tanto para las limitaciones del ictus como de otras patologías ya que:

- (I) podrían suprimir la actividad del tPA en el flujo sanguíneo de forma temporal y así, reducir el riesgo de hemorragia intracraneal y sistémica;
- (II) el vaso ocluido podría ser el único objetivo del tPA para así, mejorar su eficacia;
- (III) mejoraría la penetración del tPA en los coágulos para que la recanalización del vaso ocluido sea completa;
- (IV) aumentaría el área superficial expuesta una vez que los microagregados se rompiesen en sus componentes nanométricos, mejorando aún más la liberación o actividad de los fármacos inmovilizados en los vehículos (Korin et al., 2013);

- (V) supondría reducir la dosis necesaria de fármaco efectiva (Korin et al., 2015). En estudios de administración de SA-NTs en ratones con embolismo pulmonar se ha visto que con una cantidad de 50 ng/ml de fármaco es suficiente para normalizar la presión de la arteria pulmonar, mientras que se necesita una dosis cien veces mayor de fármaco libre para conseguir el mismo efecto. Debemos destacar que la administración de dicho fármaco revirtió el nivel patológico de la presión de la arteria pulmonar, y lo llevo hasta niveles basales normales, usando de nuevo una centésima parte de la necesaria cuando se administra por vía intravenosa (Korin et al., 2012);
- (VI) ayudaría a minimizar las hemorragias y neurotoxicidad que provoca dicho fármaco cuando difunde al tejido cerebral ya que se elimina rápidamente de la circulación y debido a su mayor tamaño en comparación con las nanopartículas, no difunden fácilmente como tPA libre (korin et al.,2012);
- (VII) conlleva a un inicio más temprano de la terapia fibrinolítica.

Todo esto llevaría a una mejora en las condiciones de seguridad y efectividad en este tipo de terapias trombolíticas.

Los métodos para la síntesis de nanopartículas de PLGA se pueden dividir, como mencionamos anteriormente, en dos clases: técnicas “Top-down” y “Bottom-up”. Las técnicas ascendentes, como polimerización en emulsión o microemulsión, polimerización interfacial y polimerización por precipitación, emplean un monómero como punto de partida. La evaporación de la emulsión, el desplazamiento del disolvente y la difusión de la emulsión, son técnicas descendentes en las que las nanopartículas se sintetizan a partir del polímero preformado (Korin et al., 2012).

La encapsulación de fármacos en nanopartículas de PLGA también ofrece la capacidad de adaptar el perfil de liberación controlada de las drogas. Además, nuestras nanopartículas de PLGA terminadas en ácido (COOH) permiten la modulación de la química de la superficie para unir los restos terapéuticos.

Como podemos observar en las siguientes figuras 8 y 9, la formulación de estos sistemas se puede realizar recubriendo el microagregado con el fármaco, tPA o las nanopartículas.



Figura 8. Esquema del proceso de fabricación de SA-NTs. Primero, se producen nanopartículas de PLGA (~ 200 nm de tamaño). Éstas se secan por pulverización con excipientes solubles en agua para producir agregados de NP bien definidos a escala micrométrica. Los agregados se recubren luego con tPA usando un enlazador (Adaptada de Korin et al., 2013)

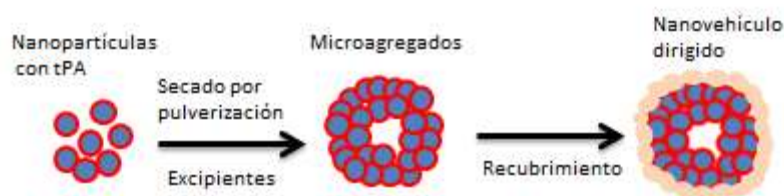


Figura 9. Esquema del proceso de fabricación de SA-NTs. Existe otra alternativa para la formulación de estos sistemas; comienza con la fabricación de nanopartículas y la adhesión del tPA a estas, después se forman los microagregados y por último se recubren (Adaptada de Korin et al., 2012)

Las nanopartículas (NP) se prepararon usando un método de desplazamiento de disolvente a partir de PLGA. En primer lugar, se hizo una disolución con el polímero, dimetilsulfóxido (DMSO); se dializó con agua a temperatura ambiente y las NP se formaron por desplazamiento del disolvente y su posterior autoensamblaje en agua. La distribución de los tamaños y la morfología de dichas nanopartículas se caracterizaron mediante, Dynamic Light Scattering (DLS), microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia electrónica de transmisión (TEM) (Korin et al., 2012).

También se ha utilizado el método de evaporación con solvente de doble emulsión para preparar NP de PLGA basadas en Fe₃O₄ y recubiertas adicionalmente con quitosano. El resultado de la unión Fe₃O₄-PLGA-tPA-Quitosano mostró funciones duales donde se podría observar la detección temprana de un trombo y también la monitorización dinámica de la eficacia trombolítica mediante un escáner MRI clínico (Wang et al., 2009).

Para la fabricación de SA-NTs se centrifugaron las NP de PLGA y se concentraron hasta una suspensión de 10 mg/ml en agua añadiendo L-Leucina. Los agregados se prepararon mediante una técnica de secado por pulverización donde la temperatura de entrada era de 80° y la velocidad de alimentación del líquido fue de 50 ml/min. La alimentación del líquido se bombeó con un caudal de 25 g/min y una presión de boquilla de 275.70 Pa. Las condiciones de secado por pulverización se delimitaron y controlaron para mantener la temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea (Tg) de PLGA (<458°C), evitando la fusión de nanopartículas de PLGA (Korin et al., 2012).

Las suspensiones agregadas se filtraron a través de filtros de 20 µm para descartar cualquier agregado de mayor tamaño; se centrifugaron durante 5 minutos y se lavaron para eliminar las NP libres.

La última etapa en el desarrollo de SA-NTs es funcionalizar los microagregados con el tPA. Para ello, se preactivaron las nanopartículas con 1-etil-3- (3-dimetilaminopropilo) carbodiimida (EDC) y sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) en una proporción 1:5:1 (PLGA: EDC: NHS). La mezcla se centrifugó y se lavó dos veces con PBS; posteriormente se hizo reaccionar con el enlazador NH₂-PEG-Biotina a una relación 1:10 en PBS. Los agregados enlazados se centrifugaron y se lavaron de manera consecutiva dos veces para después hacerlos reaccionar con estreptavidina.

De forma paralela, el activador de plasminógeno tisular humano se funcionalizó con biotina usando el enlazador NHS-PEG-Biotina en PBS, en una proporción 1:10. Una vez que el tPA estuvo funcionalizado se hizo reaccionar con los agregados de estreptavidina-biotina.

Se deberán explorar métodos alternativos para unir tPA a NP como, por ejemplo, la conjugación directa mediante acoplamiento o acoplamiento de amina-carboxilato basado en enlazadores de PEG heterobifuncionales biocompatibles; para evitar las respuestas inmunes asociadas con la conjugación estreptavidina-biotina y aumentar eficacia de conjugación, así como optimizar la actividad de tPA.

La actividad de partículas recubiertas con tPA se confirmó usando un ensayo de actividad fluorométrica de tPA, donde se comprobó que las partículas retuvieron

aproximadamente el 70 % de la actividad exhibido por el tPA soluble (Korin et al., 2012).

4.2. Sistema pulmonar

Los aerosoles inhalados son un medio eficaz para tratar enfermedades pulmonares como el asma, EPOC o fibrosis quística. En muchas ocasiones dichas enfermedades requieren tratamiento local en la región bronquial o alveolar.

La administración de fármacos a los pulmones mediante inhalación tiene ventajas tales como (I) alta biodisponibilidad, (II) inicio de acción rápida debido a la gran superficie que presenta, atribuible al epitelio alveolar en la región más interna de los pulmones, (III) fácil acceso a la circulación, (IV) acción sistémica y no invasiva de terapias macromoleculares, incluidos péptidos, proteínas o ADN y (VII) mejor cumplimiento de la terapia por el paciente (Muralidharan et al., 2015).

La administración del medicamento a los pulmones debe pasar por obstrucción física y obstrucción fisiológica; son tres los mecanismos por los que las partículas se depositan en las vías respiratorias: impactación, sedimentación y/o difusión. La impactación ocurre a nivel de la región nasofaríngea y traqueo-bronquial, la sedimentación en las ramificaciones de los bronquiolos terminales y la difusión en los alveolos. Las partículas se depositarán en la región de los pulmones que le corresponda dependiendo del tamaño que presenten (figura 10).

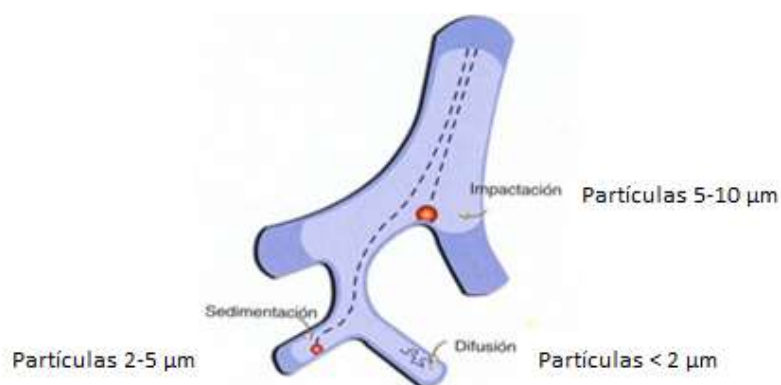


Figura 10. Mecanismos de depósito de partículas a las diferentes zonas del pulmón. Como se observa en la figura existen diferentes mecanismos de deposición de partículas en los pulmones, dependiendo de la región. De la misma manera, hay que tener en cuenta el tamaño de las partículas ya que las de mayor tamaño se quedarán en las zonas más externas por impactación mientras que las más pequeñas llegarán a las zonas más profundas del pulmón por difusión (Musante et al., 2002)

La deposición en el pulmón de las partículas inhaladas requiere un control significativo del tamaño de partícula, siendo un impedimento muy importante a la hora de utilizar el pulmón como vía de administración de fármacos para tratar localmente el tejido pulmonar o cuando se utiliza como puerta de entrada para administración sistémica. Las partículas que poseen un diámetro mayor a 15 μm están sujetas a la deposición en la boca y la garganta, mientras que las partículas de menos de 1 μm se exhalan comúnmente. Se ha visto que el tamaño más eficiente para que se depositen las partículas en las zonas más profundas del pulmón, es decir, en la zona bronquial y alveolar esta aproximadamente entre 1-3 μm (Musante et al., 2002).

Estas partículas tienen la característica de poseer grandes diámetros geométricos, pero debido a sus bajas densidades de masa muestran diámetros aerodinámicos mucho más pequeños. Fundamentalmente, en la formulación de estos sistemas hay que tener en cuenta el diámetro aerodinámico ya que este va a ser el que nos proporcione las características adecuadas para que las partículas se depositen de manera correcta en el pulmón profundo. También debemos conseguir una baja densidad de la partícula para que permita viajar a éstas por el sistema pulmonar y que no se deposite en otras regiones más superficiales.

Con el afán de intentar mejorar la estructura de los aerosoles, se empezaron a desarrollar las nanopartículas como vehículos de administración de fármacos para la vía pulmonar. Dichas nanopartículas pueden ser poco adecuadas por su tamaño, ya que como mencionamos anteriormente las partículas menores de 1 μm tienden a exhalarse después de su administración. Una ventaja que ofrecen las nanopartículas al sistema de administración pulmonar es el área superficial aumentada por masa total de partículas disponible para la adsorción del fármaco.

El poli (D, L-láctido-co-glicólido) (PLG) es un polímero muy interesante para la fabricación de nanopartículas y micropartículas para la administración de fármacos debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad, pero hay preocupaciones que rodean el uso de este polímero ya que presenta una tasa lenta de degradación y posibilidad de que se acumule en los pulmones. Sin embargo, hay estudios que demuestran la seguridad de nanopartículas de PLG en comparación con nanopartículas no degradables como de poliestireno (Dailey et al., 2006).

Peek et al. (2008) diseñaron una formulación en polvo seco inhalable que posee tanto nanoestructura como microestructura para aumentar la adsorción de un fármaco macromolecular y mejorar la administración al pulmón profundo, respectivamente. La carga eléctrica superficial fue utilizada para la floculación de nanopartículas utilizando la ovoalbúmina como fármaco modelo de proteína; se evaluaron diferentes propiedades de las nanopartículas para determinar su efecto sobre la adsorción de proteínas. Factores como la fuerza iónica, la relación proteína-partícula, la concentración total proteína-partícula y la carga superficial de las nanopartículas influyen en la formación, tamaño y densidad de las nanopartículas floculadas. La ovoalbúmina se liberó de las nanopartículas floculadas y se mantuvo la estructura de la proteína nativa determinándose mediante fluorescencia.

Este método de formulación aprovecha la aglomeración de las nanopartículas en solución y puede ser una buena alternativa al secado por pulverización cuando se formulan aerosoles de polvo seco. Pero como podemos observar en la figura 11 la forma de estos agregados es amorfa.

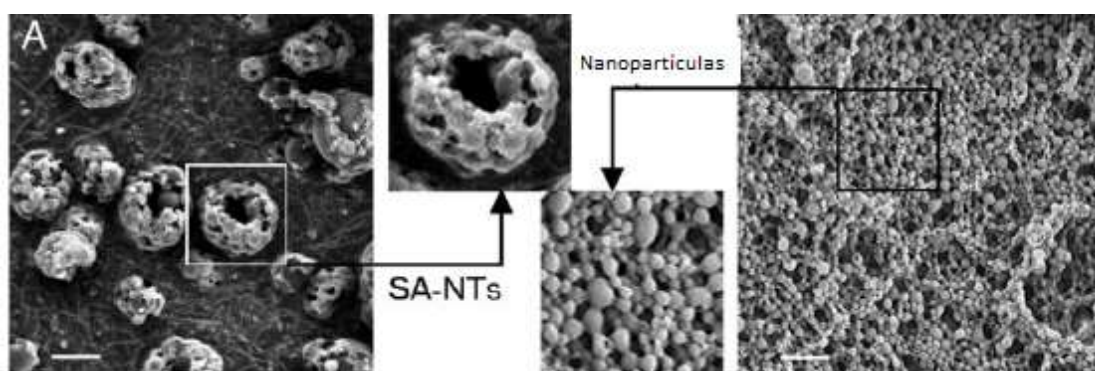


Figura 11. Forma amorfa de los microagregados de nanopartículas (Korin et al.,2012).

Se empleó el método de evaporación de disolvente de emulsión para crear nanopartículas catiónicas, aniónicas y neutras con una solución de PLG con 1,2-dioleoiloxi-3 (trimetilamonio) propano (DOTAP) catiónico, Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) catiónico, Dioctilsulfosuccinato de sodio (DSS) aniónico y Acetato de poivinilo (PVA) neutral, como agentes tensioactivos. Pudo determinarse que las partículas resultantes de la solución con DOTAP estaban cargadas positivamente y se cargaban menos positivamente cuando se usaba CTAB, las partículas neutras se lograron usando PVA y las partículas con carga negativa se

generaron usando DSS como material de recubrimiento. Una vez precipitadas las nanopartículas se lavaron con agua doblemente desionizada (ddH₂O) y se sonicaron en un baño para romper los posibles aglomerados. Mientras que la carga superficial de la mayoría de las partículas permaneció constante, las partículas preparadas con CTAB mostraron un descenso de ésta después de hasta cinco lavados posteriores, esto puede sugerir que CTAB se fue eliminando gradualmente de la superficie de las nanopartículas con dichos lavados.

A la hora de adherir la ovoalbúmina, fármaco macromolecular modelo, a las nanopartículas, se utilizó el punto isoeléctrico de ésta, 4.6; por lo que se esperaba una carga negativa neta sobre la proteína a pH neutro. La mayor capacidad de adsorción observada a las nanopartículas catiónicas sugiere que las fuerzas electrostáticas pueden ser responsables de la adsorción. Sin embargo, también se observó que se adsorbía a nanopartículas aniónica a niveles más bajos, lo que indica que otras fuerzas como por ejemplo, Van der Waals o enlaces de hidrógeno desempeñan un papel importante.

La comparación de los tamaños geométricos y las distribuciones de tamaño de los floculados en soluciones de ddH₂O y PBS, tampón fosfato, revelaron que la presencia de sal aumentaba la capacidad de las nanopartículas para formar floculados. Esta influencia de la fuerza iónica sobre la formación de los floculados confirma la interacción entre cargas y no una agregación.

Las funciones de la ovoalbúmina y las sales para facilitar la floculación también tienen implicaciones en la cantidad de fármaco que se puede cargar. En ausencia de sal, solo la ovoalbúmina está involucrada en los floculados, pero se ha visto que con proporciones de ovoalbúmina-partícula de $\sim 0,12$ se incorpora aproximadamente 3-4 veces más ovoalbúmina en los floculados de ddH₂O que en PBS. La adsorción reducida de ovoalbúmina en presencia de PBS sugiere una unión competitiva entre los iones de sal y la ovoalbúmina. También se observó que a medida que se adsorbió más ovoalbúmina, la carga superficial se redujo, neutralizó y se volvió ligeramente aniónica tras la saturación de la superficie de las partículas. En ausencia de sal, la unión de la ovoalbúmina se saturó aproximadamente a 70 μg de ovoalbúmina. $\sim 3,5$ μg de ovoalbúmina adsorbida por área superficial total.

Debido a la forma de administración de estos fármacos hay que tener en cuenta el efecto de la agitación y el cizallamiento durante el volteo en el dispositivo. Se esperaba que un aumento en la cizalladura interrumpiría la formación de la floculación y redujese el tamaño de dichos flóculos, por lo que sería otra variable que tendría que ajustarse para optimizar el tamaño de las nanoagrupaciones para lograr la máxima fracción de partículas finas, $<5\ \mu\text{m}$.

En general, después de la liofilización de los floculados se pudo comprobar que poseían diámetros aerodinámicos deseables para la liberación al pulmón profundo, es decir, $\sim 1\text{-}3\ \mu\text{m}$. Además, se observó una adhesión insignificante a las paredes de la cámara, lo que sugiere que estas estructuras pueden solventar los problemas asociados con la deposición dentro del inhalador, común para algunas formulaciones de aerosoles de polvo seco (Peek et al., 2013).

Muralidharan et al. (2015) han demostrado el potencial para la administración pulmonar de IgG humana utilizando una partícula nano en micro fabricada simultáneamente. Este proceso, elaborado por el método de secado por pulverización permitió la penetración pulmonar profunda y aproximadamente 35 días de liberación de IgG. Esta formulación reduce la interacción partícula-partícula además de una mejor manipulación y liberación de nanopartículas.

La adición de algunos polímeros como Poli(etilenglicol) (PEG), metoxi-poli(etilenglicol) (MPEG) o 1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC) a la superficie de las nanopartículas para hacerla hidrófila puede hacer que dicha nanopartícula sea mucopenetrante o capaz de escapar del ataque de la opsonina. La matriz de la partícula puede consistir únicamente en nanopartículas o en excipientes farmacéuticos inertes adicionales como aminoácidos, azúcares o fosfolípidos.

Los nanoagregados se formaron uniendo las nanopartículas con un excipiente, principalmente PLGA, ya que presenta buenas propiedades de liberación controlada y estabilidad coloidal mejorada.

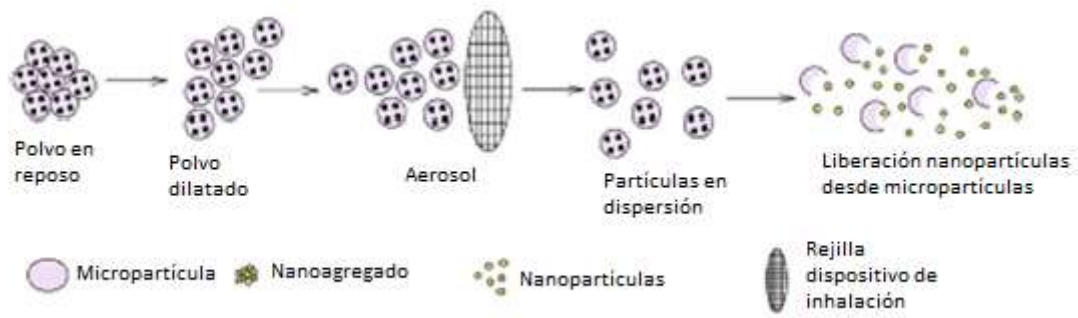


Figura 12. Esquema de liberación de nanopartículas a partir de micropartículas en el pulmón. En primer lugar, las micropartículas deberán de pasar por la rejilla del dispositivo de inhalación y una vez que lleguen al lugar de acción se liberarán las nanopartículas de la estructura (Adaptada de Muralidharan et al., 2015)

Las partículas más grandes reducen la tendencia de las partículas a agregarse en el dispositivo inhalador lo que asegurará la liberación adecuada del polvo, mientras que la partícula más pequeña evitará la deposición en otro lugar del tracto respiratorio que no sea el pulmón profundo.

5. CONCLUSIÓN

La formulación de microagregados de nanopartículas para direccionar fármacos ha resultado ser una estrategia efectiva para patologías donde la característica principal era una estenosis vascular; gracias a la fuerza de cizalla que experimentaba la región estenosada los microagregados se podrían descomponer en sus estructuras nanométricas y así deshacer el coágulo. La administración de estos sistemas de tPA ha proporcionado grandes ventajas frente a los fármacos convencionales, pero se debe optimizar el desarrollo de esta formulación para evitar al máximo el riesgo de hemorragia que provoca este fármaco trombolítico

Además, hemos podido comprobar que estos microagregados tienen aplicaciones en el sistema respiratorio, además del vascular. Con la administración de estas estructuras se han podido combinar tanto nanopartículas como micropartículas para una máxima carga del fármaco y una liberación eficiente al pulmón profundo. Para ello debemos considerar en gran medida el diámetro aerodinámico para que las partículas lleguen al lugar de acción.

Tanto las nanopartículas como los microagregados de éstas se pueden formular por diferentes métodos, en los cuales se ha visto que el polímero PLGA es el más adecuado para su desarrollo ya que es biodegradable y biocompatible pudiendo así, cumplir con la seguridad y eficacia que precisan estos fármacos.

Con los nuevos avances de la nanotecnología empieza un largo camino en la investigación de nuevos polímeros, características de las nanopartículas y enfermedades que pueden aprovechar dicha tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

- Aston R, Saffie-Siebert R, Canham L, Ogden J. Nanotechnology Applications for Drug Delivery. *Pharm Technol Eur.* 2005;17(4):21–8
- Baptista PV. Nanodiagnostics : leaving the research lab to enter the clinics ? *Molecular nanodiagnostics.* 2014;1(4):305–9
- Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Phys.* 2011;12(7):620–36
- Dailey LA, Jekel N, Fink L, Gessler T, Schmehl T, Wittmar M, et al. Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;215(1):100–8
- Davies 2009. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Engineering.* 2010;6(1):16–26
- Dawidczyk CM, Russell LM, Searson PC. Nanomedicines for cancer therapy: state-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Front Chem.* 2014;2(August):1–13
- Doello K, Cabeza L, Ortiz R, Arias JL, Melguizo C, Prados J. Magnetic Nanoparticules in Cancer Diagnosis and Treatment. *Actual Medica.* 2015;100(796):139–44
- Dowling A, Clift R, Grobert N, Hutton D, Oliver R, O’neill O, et al. Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties. *London R Soc R Acad Eng Rep.* 2004;46(July):618–618
- Epshtein M, Korin N. Shear targeted drug delivery to stenotic blood vessels. *J Biomech.* 2017;50:217–21
- Haile WB, Wu J, Echeverry R, Wu F, An J, Yepes M. Tissue-Type Plasminogen Activator has a Neuroprotective Effect in the Ischemic Brain Mediated by Neuronal TNF- α . *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(1):57–69
- Isaacoff BP, Brown KA. Progress in Top-Down Control of Bottom-Up Assembly. *Nano Lett.* 2017;17(11):6508–10
- Korin N, Gounis MJ, Wakhloo AK, Ingber DE. Targeted drug delivery to flow-obstructed blood vessels using mechanically activated nanotherapeutics. *JAMA Neurol.* 2015;72(1):119–22
- Korin N, Kanapathipillai M, Ingber DE. Shear-responsive platelet mimetics for targeted drug delivery. *Isr J Chem.* 2013;53(9–10):610–5
- Korin N, Kanapathipillai M, Matthews BD, Crescente M, Brill A, Mammoto T, et al. Shear-activated nanotherapeutics for drug targeting to obstructed blood vessels. *Science (80-).* 2012a;337(6095):738–42
- Korin N, Kanapathipillai M, Matthews BD, Crescente M, Brill A, Mammoto T, et al. Shear-Activated Nanotherapeutics for Drug Targeting to Obstructed Blood Vessels. *Science (80-).* 2012b;337(6095):738–42

- Lechuga LM. Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud. *Biotechnol Appl a la Salud Humana*. 2010
- Medsker B, Forno E, Simhan H, Juan C, Sciences R. Tissue plasminogen activator-based nanothrombolysis for ischemic stroke. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018;15(2):173–84
- Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Mater*. 2013;12(11):991–1003
- Muralidharan P, Malapit M, Mallory E, Hayes D, Mansour HM. Inhalable nanoparticulate powders for respiratory delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015;11(5):1189–99
- Musante CJ, Schroeter JD, Rosati JA, Crowder TM, Hickey AJ, Martonen TB. Factors affecting the deposition of inhaled porous drug particles. *J Pharm Sci*. 2002;91(7):1590–600
- Peek L, Roberts L, Berkland C. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticle Agglomerates as Carriers in Dry Powder Aerosol Formulation of Proteins. 2013;24(17):9775–83.
- Press D. Application of nanodiagnostics in point-of-care tests for infectious diseases. 2017;4789–803
- Runowski M. Nanotechnology – nanomaterials, nanoparticles and multifunctional core/shell type nanostructures. 2016;68(9):766–75
- Samson M, Porter N, Orekoya O, Hebert JR, Adams SA, Bennett CL, et al. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. 2017;155(1):3–12
- Saxer T, Zumbuehl A, Müller B. The use of shear stress for targeted drug delivery. *Cardiovasc Res*. 2013;99(2):328–33
- Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*. 2000;11 Suppl 2:S81–91
- Torchilin VP. Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*. 2007;24(1):1–16
- Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(11):813–27
- Wang SS, Chou NK, Chung TW. The t-PA-encapsulated PLGA nanoparticles shelled with CS or CS-GRGD alter both permeation through and dissolving patterns of blood clots compared with t-PA solution: An in vitro thrombolysis study. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2009;91(3):753–61